

University of Groningen

## The ABC of ABC-transport in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*

Koning, S

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2003

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Koning, S. (2003). *The ABC of ABC-transport in the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## Nederlandse samenvatting

### Archaea en hyperthermofielen

De levende organismen op onze aarde kunnen verdeeld worden in twee groepen, de prokaryoten en de eukaryoten. Eukaryote cellen hebben een celkern, een apart compartiment in de cel, waar zich het erfelijk materiaal, het DNA zich bevindt. Het DNA in de prokaryote cel zit niet in een celkern. De eukaryoten, dat zijn wij, samen met ondermeer de dieren, planten en schimmels. De prokaryoten zijn de bacteriën en de archaea. De archaea lijken erg op bacteriën maar in bepaalde eigenschappen lijken ze weer meer op eukaryoten. Vandaar dat ze een eigen groep vormen binnen de prokaryoten.

Waarom zijn archaea nu zo interessant? Archaea komen vaak voor en groeien in omgevingen waar de mens niet zou overleven. De (hyper)thermofiele archaea groeien het best bij temperaturen tussen de 55 en 113 °C. Psychrofielen groeien bij lage temperatuur zoals op Antarctica, barofielen doen het alleen onder grote druk, acidofielen gedijen in een zure omgeving (pH 0,5 tot 4), terwijl alkalifielen juist in een basische (zeepachtige) omgeving leven (pH 8 tot 11,5). En tenslotte halofielen die alleen bij zeer hoge concentraties zout gedijen, zoals in de Dode Zee. Er zijn uiteraard ook archaea die alleen groeien bij een combinatie van

extreme omstandigheden, bijvoorbeeld een acidofiel thermofiel.

Archaea die onder extreme omstandigheden leven, zijn interessant vanwege het feit dat zij kunnen groeien daar waar wij het niet kunnen. Het opent ook unieke mogelijkheden voor de industrie. Enzymen en andere eiwitten gewonnen uit deze extremofielen, zijn erg stabiel. De industrie gebruikt deze stabiele enzymen om op een schonere en efficiëntere manier bepaalde processen te laten verlopen. Maar ook voor het fundamentele onderzoek is er genoeg te onderzoeken aan deze extremofielen. Waarom kunnen deze organismen overleven onder deze extreme omstandigheden? Als een ei gekookt wordt, wordt het hard vanwege de eiwitten in het ei, die de hoge temperatuur niet aankunnen en samenklonteren. Echter, een hyperthermofiele archaeon voelt zich juist lekker bij deze temperatuur en zijn eiwitten kunnen onder die omstandigheden prima functioneren. Dit lijkt in eerste instantie vreemd, omdat de bouwstenen van de archaeale cel gelijk aan die van andere cellen zijn. Het is de combinatie, ofwel de volgorde, van de bouwstenen in deze eiwitten die bepaalt of een eiwit onder de extreme omstandigheden stabiel is of niet.

Mijn onderzoek richtte zich op een hyperthermofiele archaeon. Hyperthermofielen komen voor op plaatsen

## Chapter 7

waar de omgeving verhit wordt door vulkanische activiteit. Veel van deze hyperthermofielen komen voor in de (diep)zee. Bij breuken in de aardkorst spuit het hete gesteente uit het binnenste van de aarde in zee. De lava, die uit de aardkorst omhoog komt is zeer heet, zo'n 400 °C. Het zeewater is koud circa 4 °C. Op die plaatsen ontstaan een soort torens waaruit zwarte 'rook' lijkt te ontsnappen. Deze 'rokende' torens worden Black-smokers genoemd. Door het koude zeewater en de hete lava bestaat er rondom zo'n black-smoker een enorm temperatuursverval, waardoor de in het hete water opgeloste mineralen als een zwarte gloed neerslaan. Rondom black-smokers komen allerlei organismen voor, die zich aangepast hebben aan de hoge temperaturen, bijvoorbeeld kokerwormen en mossels. Hoewel deze organismen zich dus dicht bij de black-smoker bevinden met zijn hoge temperatuur, kunnen ze alleen overleven door het temperatuursverval. Kokerwormen bijvoorbeeld kunnen overleven bij een maximum temperatuur van 40 °C, terwijl sommige hyperthermofiele archaea zelfs nog bij 113 °C kunnen leven. Niet alleen in de diepzee komen van die heetwaterbronnen voor, ook op een paar meter diepte. Hyperthermofiele archaea worden ook aangetroffen bij geisers en warmwaterbronnen, bijvoorbeeld in het Yellowstone Park in de Verenigde Staten.

### Mijn onderzoek

De archaeon, die tijdens mijn onderzoek bestudeerd is, *Pyrococcus furiosus*, is gevonden in Italië in de aardlagen van een heetwaterbron in zee vlakbij Volcano Island. Het organisme werd voor het eerst beschreven in 1987. *P. furiosus* is een hyperthermofiele archaeon, die zich alleen prettig voelt bij temperaturen tussen de 70 en 105 °C. De mens heeft zuurstof uit de lucht nodig om te overleven, *P. furiosus* is een anaëroob organisme en kan alleen leven als er geen zuurstof in zijn omgeving aanwezig is. Onder een microscoop bekeken, is het een bolletje met een staartje. Het staartje wordt gebruikt om zich voort te bewegen. De naam *Pyrococcus furiosus* zegt iets over zijn groei-eigenschappen en het uiterlijk. Het betekent letterlijk furieuze vuurbal. *P. furiosus* is een zeer snel groeiend organisme. Onder optimale omstandigheden verdubbelt deze archaeon zich elke 30 minuten.

Archaea zijn vrij aanwezig in het zeewater, maar kunnen alleen groeien bij de hogere temperaturen. De archaea moeten dus, zodra ze in een omgeving zijn met de juiste temperatuur, voedsel zien te vinden. Dat voedsel bestaat voor *P. furiosus* uit suikers en eiwitten. Deze voedingsstoffen moeten eerst opgenomen worden door de cel voordat ze gebruikt kunnen worden voor de groei en onderhoud. Omdat er zich om de cel een ondoordringbare vetachtige laag bevindt, de membraan genaamd, moeten de

## Nederlandse samenvatting

voedingsstoffen deze laag eerst passeren. Dit gebeurt door middel van kanaaltjes, die worden gevormd door speciale eiwitten, de zogenaamde transporteiwitten. De transporteiwitten transporteren voedingsstoffen de cel in, terwijl ze de afvalstoffen weer de cel uit transporteren. Tijdens mijn onderzoek is een aantal van deze transporteiwitten van *P. furiosus* bestudeerd.

*P. furiosus* kan groeien op een aantal verschillende suikers, bijvoorbeeld maltose, cellobiose en zetmeel. Voor mijn onderzoek was al wel het een en ander bekend hoe *P. furiosus* de suiker kan afbreken om hier energie uit te halen, het zogenaamde metabolisme. Het was echter niet bekend hoe de suikers de cel binnen komen. Dat was de belangrijkste vraag tijdens het onderzoek. We hebben gevonden dat *P. furiosus* voor elke suiker een ander transporteiwit gebruikt. Voor de belangrijkste suikers hebben we drie verschillende transporteiwitten kunnen identificeren, die allen tot de zogenaamde familie van ABC-transporters behoren. ABC staat voor ATP bindende cassette. De ABC-transporters behoren tot een grote familie van transporteiwitten en worden gevonden in alle bacteriën, archaea en eukaryoten, waaronder de mens. ATP, adenosine trifosfaat, is de energievorm die deze transporteiwitten gebruiken om de verbindingen over de celmembraan te transporteren. De ATP bindende cassette slaat dus op het gedeelte van het transporteiwit, dat het ATP bindt en dat is

gelijk voor alle transporteiwitten die tot deze grote familie behoren.

Een ABC-transporteiwit complex bestaat uit een zogenaamd bindingseiwit, twee eiwitten, die samen een kanaaltje vormen in het membraan en twee eiwitten, die aan de binnenkant van de cel voor energie zorgen. Het bindingseiwit bevindt zich aan de buitenzijde van de cel en vangt de suikers uit de omgeving, houdt deze vast en geeft ze vervolgens door aan de twee eiwitten, die het kanaaltje in het membraan vormen. Onder verbruik van ATP worden de suikers vervolgens door het kanaaltje geleid en komen ze in de cel terecht. In de cel worden de suikers dan verder afgebroken en omgezet in energie in de vorm van ATP.

Omdat *P. furiosus* in zee leeft en niet in een afgesloten gedeelte, moet het organisme in staat zijn suikers uit de omgeving direct op te nemen, en wel zo snel en zo veel mogelijk anders spoelen deze suikers weg. Het bindingseiwit van *P. furiosus* is in staat de suikers al bij zeer lage concentratie zeer efficiënt te binden. Opvallend is, dat dit efficiënter gebeurt dan met bindingseiwitten van organismen, die bij 37 °C groeien. *P. furiosus* moet dus snel kunnen reageren op de aanwezigheid van een bepaalde suiker. Voor een organisme is het niet optimaal om altijd alle transporteiwitten aan te moeten maken, aangezien dit veel energie en bouwstoffen kost. We hebben gevonden, dat *P. furiosus* alleen die transporteiwitten aanmaakt, die het organisme op dat moment nodig heeft om suikers uit zijn omgeving op te nemen.

## Chapter 7

Dus als *P. furiosus* groeit op cellobiose, is alleen het ABC-transportstelsel voor cellobiose aanwezig. Tijdens mijn onderzoek heb ik de genen, coderende voor de verschillende bindingseiwitten, overgezet in de bacterie *E. coli* waarna deze de soortvreemde bindingseiwitten aanmaakte. Hierdoor was het mogelijk om aan te tonen welk gen codeert voor welk type suiker-bindingseiwit. Ook hebben we de verschillende bindingseiwitten gezuiverd van andere eiwitten, zodat we de bindingseiwitten konden bestuderen zonder de mogelijk storende invloed van andere eiwitten. Door middel van deze experimenten was het mogelijk om vast te stellen welke suikers wel en niet gebonden worden door de verschillende bindingseiwitten. Verrassend was het resultaat dat bepaalde suikers door deze bindingseiwitten werden herkend, waarvan niet bekend was dat *P. furiosus* hierop kon groeien. Deze suikers blijken nu ook groeisubstraten te zijn.

De volledige erfelijke informatie, de zogenaamde genomsequentie, van *P. furiosus* en twee andere *Pyrococcus* soorten, *P. abyssi* en *P. horikoshii* is bekend. We hebben gekeken in de genomsequenties welke bindingseiwitten aanwezig en welke afwezig zijn. Hoewel de drie soorten verwant zijn aan elkaar hebben ze niet allemaal dezelfde bindingseiwitten. Opmerkelijk is, dat *P. abyssi* en *P. horikoshii* bindingseiwitten hebben die waarschijnlijk bepaalde suikers herkennen, terwijl het bekend is, dat beide soorten niet op suikers kunnen groeien. Waarschijnlijk missen ze andere eiwitten, die noodzakelijk zijn om op suikers te kunnen groeien.

Mijn onderzoek heeft tot een groter inzicht geleid in de mechanismen van suikertransport in *P. furiosus*. Hierdoor is een completer beeld verkregen van het suiker-metabolisme in *P. furiosus* en verwante soorten.

